

Brazilian Journal of Development

Avaliação Ponderal e Screening Hipocrático de Camundongos Tratados com Nerolidol

Ponderal Evaluation and Hypocratic Screening of Nerolidol Treated Mice

DOI:10.34117/bjdv6n1-375

Recebimento dos originais: 30/11/2019

Aceitação para publicação: 31/01/2020

Danielle Feijó de Moura

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

E-mail: danielle.feijo@hotmail.com

Tamiris Alves Rocha

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Dayane de Melo Barros

Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil.

Marllyn Marques da Silva

Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células (NANOBIODEL), Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil.

Silvio Assis de Oliveira Ferreira

Laboratório de Bromatologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil.

René Duarte Martins

Espaço Farmácia Viva, Centro Acadêmico de Vitoria, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil.

Márcia Vanusa da Silva

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Núcleo de Bioprospecção da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido, Paraíba, Brasil.

RESUMO

A natureza é uma importante fonte de novos agentes terapêuticos, com isso a quantidade de medicamentos à base de produtos naturais ou de fitoconstituintes tem aumentando cada vez mais. O nerolidol é um sesquiterpeno acíclico presente em Óleos Essenciais (OE) de diferentes espécies botânicas e é amplamente utilizado como agente aromatizante pelas indústrias alimentícias e sob o ponto de vista terapêutico possui algumas propriedades farmacológicas importantes tais como: antineoplásica, leishmanicida, ansiolítica, potencializadora para permeação de drogas terapêuticas na forma transdérmica, larvicida, antioxidante e antimicrobiana. O uso de produtos naturais e fitoconstituintes no tratamento de doenças vêm crescendo ao longo do tempo, e muitas vezes sua utilização é realizada de

forma indiscriminada por grande parte da população, podendo inclusive causar sinais e sintomas de toxicidade. Para avaliar a toxicidade produzida por uma substância são realizados testes de toxicidade que resultarão em informações utilizadas para a sua classificação toxicológica. Logo, o objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação ponderal e screening hipocrático de camundongos tratados com o nerolidol, a fim de verificar uma possível toxicidade desse composto. A avaliação do peso e a triagem farmacológica comportamental foi realizada em camundongos machos. Um grupo recebeu a administração por via oral de 2000 mg/kg de nerolidol enquanto que o outro grupo recebeu o veículo de diluição (PBS e 10% de DMSO). Após as respectivas administrações, os camundongos foram monitorados quanto aos parâmetros comportamentais por 4h e avaliação ponderal foi realizada durante 14 dias consecutivos. Não foi observada morte dos animais, na avaliação aguda do nerolidol sobre camundongos Swiss no período de 14 dias. Da mesma forma, nenhuma alteração em relação ao screening hipocrático foi observada, sendo o comportamento do grupo tratado semelhante ao do grupo controle em ambas as doses. O ganho de peso obtido com a dose avaliada foi semelhante com o grupo controle, evidenciando que o nerolidol não demonstrou toxidez nos modelo experimental avaliado.

Palavras-chave: Nerolidol. Óleos Essenciais. Toxicologia. Triagem comportamental.

ABSTRACT

Nature is an important source of new therapeutic agents, with which the number of medicines based on natural products or phytochemicals is increasing. Nerolidol is an acyclic sesquiterpene present in Essential Oils (EO) from different botanical species and is widely used as a flavoring agent by the food industries and under the therapeutic point of view it has some important pharmacological properties such as: antineoplastic, leishmanicidal, anxiolytic, enhancer for permeation of therapeutic drugs in transdermal, larvicidal, antioxidant and antimicrobial form. The use of natural products and phytochemicals in the treatment of diseases has grown over time, and many times their use is carried out indiscriminately by a large part of the population, and may even cause signs and symptoms of toxicity. To assess the toxicity produced by a substance, toxicity tests are carried out that will result in information used for its toxicological classification. Therefore, the objective of the present study was to carry out a weight assessment and hypocritic screening of mice treated with nerolidol, in order to verify a possible toxicity of this compound. Weight assessment and pharmacological behavioral screening was performed in male Swis mice. One group received oral administration of 2000 mg / kg of nerolidol while the other group received the dilution vehicle (PBS and 10% DMSO). After the respective administrations, the mice were monitored for behavioral parameters for 4 hours and weight assessment was performed for 14 consecutive days. No death of the animals was observed in the acute evaluation of nerolidol in mice in the period of 14 days. Likewise, no changes in relation to hypocritic screening were observed, the behavior of the group being treated as a control group in the form of doses. The weight gain obtained with the evaluated dose was similar with the control group, showing that nerolidol did not show toxicity in the evaluated experimental model.

Keywords: Nerolidol. Essencial oils. Toxicology. Behavioral screening.

1 INTRODUÇÃO

A natureza é uma fonte abundante de novos recursos terapêuticos, logo, o uso de medicamentos à base de produtos naturais ou de fitoconstituintes tem aumentando de maneira crescente. Vários compostos, principalmente de origem vegetal têm despertado o interesse da comunidade científica, dentre esses, o nerolidol, composto presente em diversos Óleos Essenciais (OE) de plantas como: *Croton argyrophyllodes* Muell. Arg., *Piper aduncum* L., *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Sm. e *Zornia brasiliensis* Vogel (Moura; Martins; Silva, 2019).

O nerolidol é um sesquiterpeno acíclico de fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$, este composto é amplamente utilizado como agente aromatizante pelas indústrias alimentícias e apresenta um grande interesse para a indústria de cosméticos em virtude de ser um fixador natural. Sob o ponto de vista terapêutico, algumas propriedades farmacológicas já foram atribuídas a esse composto, tais como antineoplásica, leishmanicida, ansiolítica, potencializadora para permeação de drogas terapêuticas na forma transdérmica, larvicida, antioxidante e antimicrobiana (Arruda et al., 2005; Nogueira Neto et al., 2013; Yamane et al., 2013).

O uso de produtos naturais e fitoconstituintes no tratamento de doenças tem crescido ao longo do tempo, e muitas vezes sua utilização é realizada de maneira indiscriminada por grande parte da população, no entanto, em muitos casos, a utilização inadequada pode desencadear doenças crônicas e agudas conforme a parte utilizada, formas de uso, dose e tempo de utilização (Carvalho et al., 2015; Seca; Pinto, 2019).

Testes de toxicidade são métodos utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada durante um período não superior a 24h, seguido do monitoramento do modelo experimental (animais) por 14 dias após essa administração (OECD, 2001). Estes testes demonstram informações relevantes de toxicidade aguda e letalidade utilizando um número reduzido de animais quando comparado ao teste clássico de DL50 (Dipasquale; Hayes, 2001).

Nos testes de toxicidade também é realizada uma triagem comportamental que serve para facilitar a identificação de uma possível atividade do composto no Sistema Nervoso Central (SNC) bem como, indicar os efeitos do mesmo sob o comportamento dos animais (Almeida, 2006). Devido a escassos relatos na literatura acerca dos possíveis efeitos toxicológicos produzidos pelo nerolidol em ensaios pré-clínicos, o estudo teve como objetivo

realizar uma avaliação ponderal e screening hipocrático de camundongos tratados com o nerolidol.

2 METODOLOGIA

2.1 Composto

O nerolidol ($C_{15}H_{26}O$) consistindo em isômeros *cis* e *trans* com pureza $\geq 97,0\%$, com peso molecular 222,372 g/mol e densidade 0,8700 g/mL, foi adquirido da Sigma-Aldrich® (St. Louis, EUA).

2.2 Animais

Foram utilizados para os testes, camundongos machos Swiss albinos (*Mus musculus*) com aproximadamente oito semanas de idade, pesando entre 30 e 50g, provenientes do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Durante o experimento, os animais foram aclimatados em caixas de polipropileno sob condições apropriadas (três camundongos por caixa) em uma sala com ar condicionado, sob temperatura de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}$, umidade relativa de $50 \pm 5\%$ e ciclo de claro/escuro de 12h. Os animais receberam água potável e comida *ad libitum*. O experimento foi realizado de acordo com a legislação nacional de experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 0001/2018).

2.3 Avaliação Ponderal e Screening Hipocrático

No protocolo experimental da triagem farmacológica comportamental foram utilizados três animais por grupo. Um grupo recebeu a administração por via oral de 2000 mg/kg de nerolidol diluído em PBS e 10% de DMSO enquanto que, o outro grupo recebeu o veículo de diluição (PBS e 10% de DMSO). Os animais foram submetidos a jejum de água e alimentos por 3h antes da administração dos tratamentos. Após as respectivas administrações, os camundongos foram recolocados na caixa de polipropileno (em grupos de três animais cada) e monitorados a cada trinta minutos (30, 60, 120, 180 e 240 min), durante

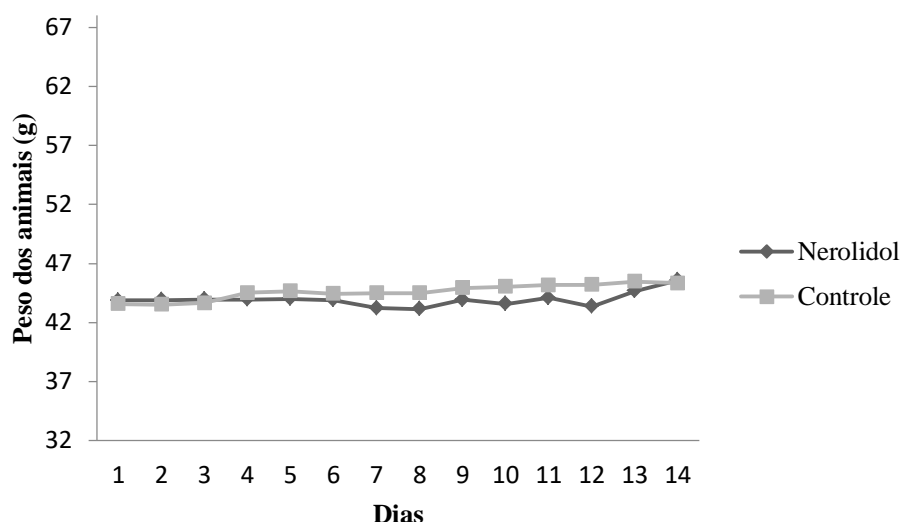
quatro horas após a administração do tratamento e a cada 24h por 14 dias consecutivos, seguindo os parâmetros comportamentais, segundo o teste screening hipocrático descrito por Malone e Robichaud (1962). Durante o período de 14 dias, os animais foram pesados diariamente para a avaliação ponderal.

Foram estabelecidos alguns critérios comparativos de acordo com Almeida et al. (1999) para uma série de comportamentos, que em sua maioria são realizados de forma comum e rotineira pelos animais, de modo que, caso ocorresse qualquer alteração comportamental em decorrência dos tratamentos administrados seria possível inferir uma relação com a atividade no SNC, Sistema Nervoso Periférico (SNP) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

Os parâmetros comportamentais avaliados foram: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta a estímulos na cauda, contorção, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte. Esses parâmetros foram classificados pela intensidade, duração e progressão, em uma escala de 0 a 3 onde: (0) Sem efeito, (1) Pouco efeito, (2) Efeito médio, (3) Efeito intenso, para posterior análise (Malone, 1962; Malone, 1977).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações clínicas diárias evidenciaram ausência de toxicidade dérmica com adequada recuperação, manutenção do estado geral, presença de atividade física, disposição para alimentar-se e ausência de mortes nos animais tratados com o nerolidol e o grupo controle negativo. Em relação à avaliação ponderal dos camundongos foi observado ganho de massa corpórea do grupo experimental, a partir das aferições realizadas de forma prévia e no decorrer de 14 dias de monitoramento após a aplicação da dose de 2000 mg/mL do nerolidol (Figura 1). O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância aplicada em animais saudáveis, pois, após a administração de quaisquer substâncias a presença de lesões dermatológicas acompanhadas de prurido e dor, inapetência e consequente perda de peso, caracterizam uma possível toxicidade do composto (Silva et al., 2005).

Figura 1. Avaliação ponderal dos camundongos tratados com nerolidol

Júnior et al. (2012) afirmaram que a variação de peso é um dos parâmetros mais utilizados em estudos toxicológicos para indicar o aparecimento, muitas vezes, precoce, da toxicidade de uma substância em um animal. Da mesma forma, outros estudos têm avaliado o ganho ou perda de peso corporal em animais submetidos a determinadas substâncias de interesse na toxicologia médica, ambiental e alimentar (Bhaskar e Mohanty, 2014; Lu et al., 2014; Mukerji et al., 2015; Das et al., 2015; Olson et al., 2015).

Os animais tratados com o nerolidol na dose de 2000 mg/mL não apresentaram mudanças comportamentais anormais quando comparados com o grupo controle, uma vez que, durante o tratamento. Os parâmetros analisados foram realizados de forma sistemática: avaliação clínica (modificações na pele, pêlos, olhos, mucosas, alterações respiratórias, circulatórias e dos SNC e SNP) e avaliação de efeitos gerais, ou seja, alterações no estado de consciência e disposição, sistema motor, tônus muscular, SNC (tremores, convulsão e sedação) e SNA (lacrimagem, salivação, ptose, piloereção e respiração). Os achados obtidos revelaram que não foram observadas alterações nesses sistemas tampouco alterações comportamentais (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Screening hipocrático de camundongos tratados com nerolidol – SNC

Parâmetros	Tempo (min)									
	30		60		120		180		240	
SNC	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
1) Estimulantes										
Agitação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ambulação aumentada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Andar em círculo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autolimpeza	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Bocejo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escalar	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Frêmito vocal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Levantar	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Movimento estereotipado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Movimentação das vibrissas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pedalar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Sacudir a cabeça	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saltos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Taquicardia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Refluxo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2) Depressores										
Abdução das patas do trem posterior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ambulação diminuída	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Caída de Straud	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Estiramento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perda do reflexo córneo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sonolência	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1

C= Controle e N= Nerolidol. Classificação dos efeitos: (0) Sem efeito, (1) Pouco efeito, (2) Efeito médio, (3) Efeito intenso.

As observações descritas na triagem comportamental servem para facilitar a investigação de uma possível atividade do composto no SNC, bem como, indicar os efeitos do mesmo no comportamento dos animais (Quintans-Júnior, 2004). Por meio do screening hipocrático foi possível obter uma estimativa geral da natureza toxicológica da concentração aplicada nos animais, analisando, estado de consciência e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividades sobre o SNC e sobre o SNA.

Tabela 2. Screening hipocrático de camundongos tratados com nerolidol – SNA

Parâmetros	Tempo (min)									
	30		60		120		180		240	
SNA	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defecação	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
Diarreia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Força para agarrar	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Lacrimejamento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micção	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiração acelerada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tônus muscular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

C= Controle e N= Nerolidol. Classificação dos efeitos: (0) Sem efeito, (1) Pouco efeito, (2) Efeito médio, (3) Efeito intenso.

Pires Júnior et al. (2012) avaliaram em camundongos a toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* que apresenta o nerolidol como constituinte majoritário e observaram que não houve morte dos animais na avaliação aguda do extrato (dose de 2000 mg/kg), no período de 14 dias. Além disso, não foi observada alteração no screening hipocrático, de modo que, o comportamento do grupo tratado foi semelhante ao do grupo controle. Quanto ao consumo de ração, não houve diferença no grupo dos camundongos tratados com o extrato e o ganho de peso obtido foi parecido com o grupo controle, evidenciando que o extrato não apresentou toxicidade frente aos parâmetros analisados o que corrobora com o presente estudo.

A toxicidade de uma substância para um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar dano grave ou morte. Vale destacar que toda substância de acordo com os princípios da toxicologia, pode ser considerada um agente tóxico dependendo das condições de exposição (doses administradas e consequentemente o quanto foi absorvido),

tempo, frequência de exposição (doses únicas ou repetidas) e vias de administração envolvida (Campos et al., 2016).

4 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos neste estudo pode-se verificar que o nerolidol não causou sinais evidentes de toxicidade aguda nos animais. Vale ressaltar que, a ausência de sinais de toxicidade aguda nesse tipo de modelo experimental ainda não é suficiente para determinar o uso terapêutico do nerolidol, pois estudos adicionais devem ser realizados a fim de avaliar a toxicidade crônica, o que agregará maior segurança para sua utilização comercial.

REFERÊNCIAS

Almeida, R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.80, p.72-76, 1999.

Almeida, R.N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., v.11, p. 131-137, 2006.

Arruda, D. C. et al. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrob Agents Chemother**, v .49, n. 5, p. 1679-1687, 2005. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1679-1687.2005>

Bhaskar, R., Mohanty, B. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: in silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. **General and Comparative Endocrinology**, v. 205, p. 2226-234, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.02.007>.

Campos, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n.1, p.373-382, 2016.

Carvalho, C. et al. Screening hipocrático de ratos tratados com extrato hidroetanólico de *Solanum auriculatum* AITON. **Revista Panorâmica online**, v. 18, p. 15-25, 2015.

Das, K. P. et al. Developmental toxicity of perfluorononanoic acid in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 51, p. 133-144, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014>.

Dipasquale, L.C.; Hayes, A.W. Acute toxicity and eye irritancy. In: Hayes, A.W. **Principles and methods of toxicology**. 4.ed. London: Taylor & Francis, v.18, p. 853-916, 2001.

Júnior, H. B. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p.512-519, 2012. <https://doi.org/10.5216/cab.v13i4.15179>.

Kharkwal, G. C. et al. Volatile terpenoid composition and antimicrobial activity of flowers of *Melia azedarach* Linn from North West Himalayas, India. **Journal of Indian Chemical Society**, v.92, p.141-145, 2015.

Lu, L. et al. Safety assessment of the fermented *Phylloporia ribis* (Lonicera japonica Thunb.) mycelia by oral acute toxicity study in mice and 90-day feeding study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, n. 69, p. 18-24, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.044>.

Malone, M.H., Robichaud, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p.320-32, 1962.

Moura, D. F., Martins, R. D., Silva, M. V. Nerolidol: Phytoconstituent of Essential Oils of Caatinga Plants. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n.12, p. 33402-33416, 2019. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n12-384>.

Mukerji, P. et al. Oral repeated-dose systemic and reproductive toxicity of 6:2 fluorotelomer alcohol in mice. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 130-143, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.12.002>.

Nogueira Neto, J. D., Sousa, D. P. D., Freitas, R. M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n.1, p.125-130, 2013.

Olson, J. A. Toxicity and efficacy differences between liposomal amphotericin B formulations in uninfected and *Aspergillus fumigatus* infected mice. **Medical Mycology**, v. 53, p. 107-118, 2015. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu070>.

OECD (Organisation for economic cooperation and development). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. **Organisation for Economic Cooperation and Development**, 2001.

Pires Júnior, H. B., Borges, L. M. F., Sousa, L. A. D. D., Cunha, L. C., Júnior, L., de Souza, R., Melo, D.F.A., Pereira, M. E. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.4, p.512-519, 2012. <https://doi.org/10.5216/cab.v13i4.15179>.

Quintans-Júnior, L. J. et al. Toxicidade aguda e alterações comportamentais induzidas pela fração de alcalóides totais das vagens de *Prosopis juliflora* (Sw) DC (Leguminosae) em roedores. **Acta Farmacêutica**, v. 23, n.1, p. 5-10, 2004.

Seca, A.M., Pinto, D.C. Potencial biológico e uso médico de metabólitos secundários. **Medicines**, v. 6, n. 66, p. 1-6, 2019. <https://doi.org/10.3390/medicines6020066>.

Silva, E. J.R. et al. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Rev. bras. Farmacogn**, v. 15, n. 2, p. 88-93, 2005.

Yamane, M. A.; Williams, A. C.; Barry, B. W. Terpene penetration enhancers in propylene glycol/water co-solvent systems: effectiveness and mechanism of action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 47, n. 12, p. 978-989, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1995.tb03282.x>